

199710002 06/11/01  
09/833675  
19  
BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

12  
Offenlegungsschrift  
10  
DE 197 55 642 A 1

51 Int. Cl.<sup>6</sup>:  
C 12 Q 1/68  
G 01 N 21/64  
C 07 H 21/04  
// C12Q 1/70

21 Aktenzeichen: 197 55 642.6  
22 Anmeldetag: 15. 12. 97  
43 Offenlegungstag: 24. 6. 99

DE 197 55 642 A 1

71 Anmelder:  
Centeon Pharma GmbH, 35037 Marburg, DE

72 Erfinder:  
Weimer, Thomas, Dr., 35075 Gladenbach, DE

56 Entgegenhaltungen:  
US 53 91 480  
WO 92 02 638 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Markierter Primer für die Polymerasekettenreaktion

57 Es wird ein markierter Primer für die Polymerasekettenreaktion beschrieben, der an den beiden Enden des Oligonukleotid-Stranges mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen, einem Reporter- und einem Quencherfarbstoff, markiert ist und bei dem wenigstens die letzten beiden zwei Basen am 3'-Ende des markierten Primers mit der zu amplifizierenden DNA-Sequenz nicht komplementär sind. Es wird außerdem ein Verfahren zum Nachweis einer DNA-Sequenz mittels der Polymerasekettenreaktion unter Einsatz des markierten Primers beschrieben, bei dem für die Amplifikation eine oder mehrere thermostabile DNA-Polymerasen eingesetzt werden, von denen eine auch Korrektüreigenschaften (proof-reading) hat und die nicht gepaarten Basen des markierten Primers zusammen mit dem daran befestigten Quencherfarbstoff freisetzt, wodurch die Fluoreszenz auf der Wellenlänge des Reporterfarbstoffes ansteigt und damit die Bildung der mit diesem Fluoreszenzfarbstoff markierten DNA-Sequenz angezeigt wird.

DE 197 55 642 A 1

Für die erfindungsgemäße Polymerasekettenreaktion können verschiedene thermostabile DNA-Polymerasen eingesetzt werden. Hat die verwendete DNA-Polymerase die Eigenschaft des proof-readings, dann kann die Reaktion mit einer einzigen Polymerase durchgeführt werden. Anderenfalls ist ein Gemisch aus mehreren thermostabilen Polymerasen einzusetzen, indem neben der Taq DNA-Polymerase z. B. auch noch die Pwo-, Vent- oder Tth-Polymerase zur Anwendung kommen können.

Das erfindungsgemäße Verfahren beruht auf der Erkenntnis, daß die ungepaarten Basen des Primers ein Angriffspunkt für die Polymerase mit Korrekturfunktion sind. Die eingesetzten thermostabilen DNA-Polymerasen weisen eine 3'→5'-Exonukleaseaktivität auf, der zur Freisetzung der nicht-hybridisierten Basen zusammen mit dem Quencherfarbstoff führt.

Das Verfahren zeichnet sich vor allem durch seine Einfachheit aus, weil nur zwei Oligonukleotide zur Durchführung der PCR erforderlich sind. Dies ist beispielsweise dann von Vorteil, wenn zum Nachweis variabler Zielfrequenzen wie von Viren konservierte Nukleinsäureabschnitte amplifiziert werden müssen bzw. gleichzeitig mehrere z. B. virale Parameter nachgewiesen werden sollen.

Die Erfindung wird durch das folgende Beispiel näher erläutert:

#### Beispiel

Zum Nachweis von Hepatitis B Virus DNS wird diese zunächst mit Hilfe von Standardverfahren extrahiert (zum Beispiel Ishizawa M., Kobayashi Y., Miyamura T., Matsuma, S: Simple procedure of DNA isolation from human serum. Nucl. Acids Res. 1991; 19: 5792). Die Amplifikation wird wie folgt angesetzt:

Zu 10 µl der extrahierten DNA werden 5 µl Mastermix (5 µl 10×PCR Reaktionspuffer, der vom Lieferanten der Polymerase mitgeliefert wird), 4 µl des Primers 1 (siehe SEQ ID No. 1 des Sequenzprotokolls) (10 pMol/µl), 4 µl Primer 2 (siehe SEQ ID No. 2 des Sequenzprotokolls) (1 pMol/µl), 4 µl dNTPs (25 mM) und 0,25 µl thermostabile Polymerase mit proof-reading-Funktion (1' bis 1,5 units) werden mit 22,75 ml Wasser gemischt und folgenden Thermozyklen unterworfen:

1. Initiale Denaturierung für 1 Minute bei 90°
2. 35 Zyklen, jeweils 28 Sekunden bei 94°C Denaturierung und 1 Minute bei 62°C Annealing und Verlängerung
3. Kühlen bei 4°C bis zur Auswertung.

Die PCR-Reaktion wird in einem Fluoreszenzspektrometer ausgewertet. Dazu wird die Fluoreszenz bei der Reporter- und Quencherwellenlänge (518 nm für FAM oder 582 nm für TAMRA) gemessen und der jeweilige Quotient aus Reporter- und Quencher wird gebildet (RQ). Der Mittelwert der Quotienten dreier Negativkontrollen (RQ) wird davon abgezogen und der errechnete Wert als ΔRQ bezeichnet. Proben mit einem ΔRQ größer oder gleich 0,3 werden als positiv gewertet, Proben kleiner als 0,3 als negativ.

## Angaben zur SEQ ID NO. 1:

Länge	:	27 Basenpaare	5
Art	:	Oligonucleotid	
Strangform:		Einzelstrang	
Topologie	:	linear	10
Herkunft	:	Chemische Synthese	
Merkmal	:	Primer	15

## Sequenzbeschreibung:

5' GAA TTT GGA GCT ACT GTG GAG TTA CTC<sup>3'</sup>

## Angaben zur SEQ ID NO. 2:

Länge	:	21 Basenpaare	
Art	:	Oligonucleotid	35
Strangform:		Einzelstrang	
Topologie	:	linear	
Herkunft	:	Chemische Synthese	40
Merkmal	:	Primer	

## Sequenzbeschreibung:

FAM-<sup>5'</sup> AGT TCT TCT TCT AGG GGA CCT<sup>3'</sup>-TAMRA

FAM und TAMRA sind Fluoreszenzfarbstoffe.

## Patentansprüche

1. Markierter Primer für die Polymerasekettenreaktion, **dadurch gekennzeichnet**, daß er
  - an den beiden Enden des Oligonukleotid-Stranges mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen, einem Reporter- und einem Quencherfarbstoff, markiert ist, und
  - wenigstens die letzten zwei Basen am 3'-Ende des markierten Primers mit der zu amplifizierenden DNA-Sequenz nicht komplementär sind.
2. Verfahren zum Nachweis einer DNA-Sequenz mittels der Polymerasekettenreaktion, **dadurch gekennzeichnet**, daß
  - einer der Primer an den beiden Enden seines Oligonukleotid-Stranges mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen, einem Reporter- und einem Quencherfarbstoff, markiert ist,